

小鼠超数排卵和成熟卵母细胞的采集

Inducing Superovulation and Isolation of Mouse Oocytes

唐蔚, 王倩雯, 俞骞, 李周结, 赵洁, 陈国元, 吴宝金*

中国科学院分子细胞科学卓越创新中心动物实验技术平台, 上海

*通讯作者邮箱: baojin.wu@sibcb.ac.cn

引用格式: 唐蔚, 王倩雯, 俞骞, 李周结, 赵洁, 陈国元, 吴宝金. (2022). 小鼠超数排卵和成熟卵母细胞的采集. *Bio-101* e1010943. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010943.

How to cite: Tang, W., Wang, Q. W., Yu, Q., Li, Z. J., Zhao, J. and Wu, B. J. (2021). Inducing Superovulation and Isolation of mouse oocytes. *Bio-101* e1010943. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010943. (in Chinese)

摘要: 先后给雌鼠注射促性腺激素 PMSG 及 HCG, 使小鼠的生殖周期及排卵时间同步化, 增加排卵数量, 用于需要大量小鼠卵母细胞或着床前胚胎的实验。

关键词: 超数排卵, 孕马血清促性腺激素 (PMSG), 人绒毛膜促性腺激素 (HCG)

材料与试剂

材料

1. 培养皿 : 35 mm、60 mm、100 mm (Corning, 货号: 353001、353002、353003)
2. 胚胎移植口吸管 (北京吉田生物科技有限公司, 规格: 1.0*500 mm)
3. 移液枪头 (Axygen, 货号: T-300-R-S、T-1000-B-R-S、T-200-Y-R-S)
4. 无菌注射器 (上海米沙瓦医科工业有限公司, 规格: 1 mL)
5. 移液管 (10 ml, corning 货号: CLS4488-200EA)
6. 离心管 (1.5ml, Axygen 货号: MCT-150-C)

动物: 提前一周从供应商订购供体雌鼠 (动物周龄参考表 1), 并饲养在独立换气系统笼盒内, 动物自由饮水、自由采食经 Co⁶⁰ 辐射的灭菌饲料。

试剂

1. 生理盐水 (0.9%氯化钠注射液)

2. 孕马血清促性腺激素 PMSG、人绒毛膜促性腺激素（HCG）（生产商：宁波三生生物科技有限公司）
3. 75%消毒酒精
4. FHM 胚胎操作液（EmbryoMax FHM HEPES Buffered Medium）（Milipore 货号：MR-025-D）
5. 透明质酸酶（HY）（SIGMA 货号：H3506）
6. KSOM 胚胎操作液（KSOM Mouse Embryo Media）（Milipore 货号：MR-121-D）
7. PMSG（见溶液配方）
8. HCG（见溶液配方）

仪器设备

1. 烧杯（50 mL，蜀牛，货号：GG-17）
2. 移液枪（200 μ l，eppenddorf）
3. 超净工作台（万里，型号：SW-CJ-2FX）
4. CO₂ 培养箱（THERMO，型号：i160）
5. 体视显微镜（Nikon，货号：SMZ800）
6. 手术剪（上海金钟，J21010）
7. 医用镊（上海金钟，J40120）
8. 眼科剪（上海金钟，Y00030）
9. 眼科直镊（上海金钟，JD1050）

实验步骤

一、诱导超数排卵

1. PMSG 和 HCG 试剂配制（方法见溶液配方）。
2. 取一只无菌注射器，吸入 PMSG 稀释液，抓取供体小鼠单手保定，腹腔注射 PMSG，目的是模仿内源性促卵泡素的作用，促进卵成熟，剂量：每只 5IU（0.1 mL）。
3. 注射 PMSG 46-48 h 后，腹腔注射 HCG 稀释液（方法同上），用人绒毛膜促性腺激素模仿促黄体素的诱导排卵作用，剂量：每只 5IU（0.1 mL）。
4. 雌鼠的性成熟度是影响超排卵数的主要因素。不同背景的小鼠超排最佳年龄也有所

不同，请参照下表：

不同品系小鼠最佳超排年龄和排卵数量

品系	超排年龄及重量	超排数量（枚）
c57	3-4w（8-12g）	40±10
ICR	3-6w（17-30g）	20±10
DBA	8-10w	20±10
BALB/C	8-10w(20-27g)	15±5
FVB	8-10w	20±5
S129	8-10w	35±5
C3H	8-10w	18±5
SWISS Webster	8-10w	30±5

二、卵母细胞的采集

1. 卵母细胞采集的时间通常在小鼠注射 hCG 后 13-16 小时内进行。
2. 打开超净工作台，准备手术剪、医用镊、眼科直镊、眼科剪等（预先经过提前高压灭菌处理或者用 75% 的酒精浸泡），紫外灯消毒 15 min。
3. 打开体视显微镜，准备卵母细胞培养滴：用 200 μ l 的移液枪取 KSOM 试剂，在 60 mm 培养皿内做若干水滴状的滴，并用矿物油覆盖，放入培养箱（37 $^{\circ}$ C、5% O_2 ）预热至少 10 min。

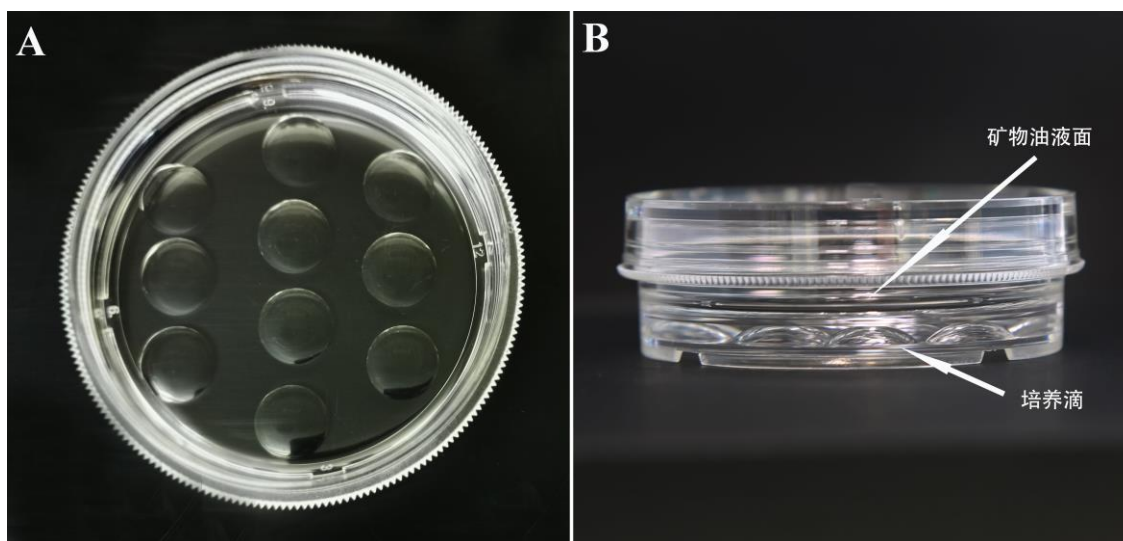


图 1. 培养滴及覆盖了石蜡油的培养皿

4. 准备组织收集滴：取出 35 mm 培养皿，加入 1 ml FHM 体外操作液。
5. 小鼠颈椎脱臼处死，75%酒精消毒腹部，打开腹腔取出输卵管，将其放入 FHM 组织收集滴内。
6. 在体式显微镜下观察到输卵管的上部（壶腹部）有一个明显的膨大处。用镊子固定输卵管，用一根 1 ml 注射针纵向撕开壶腹部，用此法将其整个撕裂，卵团会游离到液体中，如果卵团不能自己释出，可以用镊子轻轻地把它们挤出来。

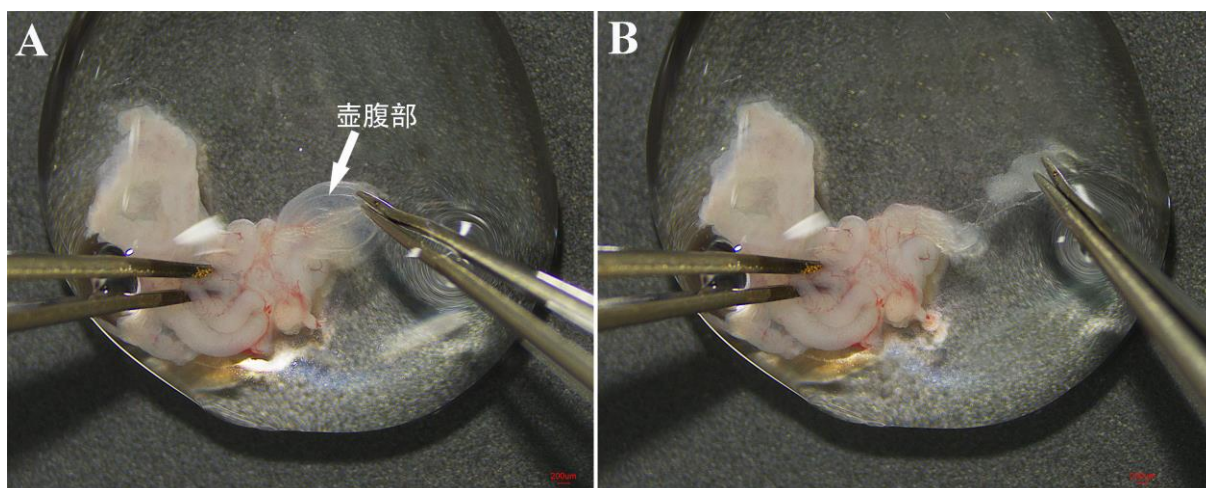


图 2. 输卵管及卵团（B 镊尖处）

7. 去除卵丘细胞：取一个 100 mm 的培养皿盖，并在上面做 8 个 100 μ l 的 FHM

滴，用 200 μ l 的移液枪将卵团收集到其中一个滴内，加入同体积的透明质酸酶（HY，0.3 mg/ml），可用移液枪轻轻吹打几下，放入 CO₂ 培养箱中，1 分钟后取出，在体视显微镜下观察卵母细胞已经分散开来，用移卵管收集卵母细胞到另外一个滴里，并用剩下的 6 个滴逐步清洗，完成后转移到事先准备好的 KSOM 滴中，放回 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中备用。

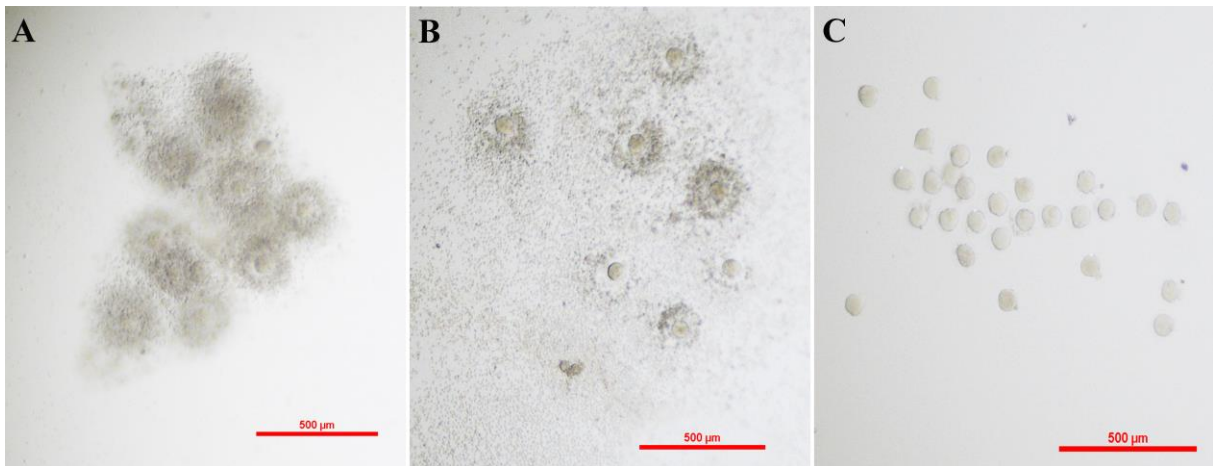


图 3. 卵母细胞的处理过程（C 为处理好的卵母细胞）

溶液配方

1. PMSG

移液器移取 20 ml 的 0.9%氯化钠注射液于 50 ml 烧杯中，用 200 μ l 移液枪将 PMSG 冻干粉末反复多次溶于其中，并混匀。浓度为 50 IU/ml。用 1ml 注射器根据实验需要的量分装到 1.5 ml 离心管中，封口膜封口，标注好名称及配制时间，置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱，可保存一个月。

2. HCG:同上述方法配置。

致谢

本实验室的胚胎操作技术主要来源于中科院分子细胞中心李劲松研究员实验室，美国洛克菲勒大学转基因平台及美国洛克菲勒大学 Peter Mombaerts 实验室。特此致谢！

参考文献

1. Andras, N., Marina, G., Kristina, V. and Richard, B.(2003). Manipulating the Mouse Embryo. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.